Ueber glutaminhaltige Polypeptide

und zur Frage ihres Vorkommens im Eiweiß.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

einer

hohen naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

BIBLIOTHEEK RIJKS UNIV. LEIDEN

Edgar v. Cramm
aus St. Petersburg

Tübingen
Druck von H. Laupp jr.
1919.

Von der Fakultät angenommen am 28 Februar 1919.

Meinem Vater.

Diese Arbeit wurde im physiologisch-chemischen Institut zu Tübingen ausgeführt.

Herrn Professor Dr. H. Thierfelder

möchte ich auch an dieser Stelle für die Anregung zu dieser Arbeit, Rat und Unterstützung bei der Ausführung derselben und das mir stets entgegengebrachte Wohlwollen meinen besonders warmen Dank aussprechen.

Während asparaginhaltige Polypeptide schon vor mehr als 10 Jahren von Emil Fischer und Ernst Königs[1]) dargestellt worden sind, waren solche, an deren Aufbau Glutamin beteiligt ist, bisher unbekannt.

Ich habe einige dieser Substanzen, und zwar 4 Dipeptide (Glycyl-d-glutamin, d-Alanyl-d-glutamin, l-Alanyl-d-glutamin, l-Leucyl-d-glutamin) und 1 Tripeptid (Glycyl-glutaminyl-glycin) bereitet und beschreibe im folgenden (S. 11) ihre Synthese und ihre Eigenschaften. Zu ihrer Gewinnung benutzte ich die von Emil Fischer angegebenen Verfahren. Für die Isolierung der halogenhaltigen Zwischenprodukte erwies sich die Extraktion mit Essigester im Lindschen Extraktionsapparat als sehr zweckmäßig. Es gelang auf diese Weise sofort, aus der Reaktionsflüssigkeit analysenreine Substanz zu erhalten.

Bei der Darstellung dieser Polypeptide verfolgte ich noch einen besonderen physiologisch-chemischen Zweck: ich wollte sie zur Prüfung der Frage, ob an dem Aufbau des Eiweißmoleküls Glutamin (und Asparagin) beteiligt ist, benutzen.

Vor einigen Jahren fanden H. Thierfelder und C. Sherwin[2]) im Harn von Menschen, welche Phenylessigsäure zu sich genommnn hatten, Phenyl-acetyl-d-glutamin. Sie konnten weiter zeigen, daß diese Verbindung nicht erst sekundär aus Phenyl-acetyl-glutaminsäure durch Amidierung entsteht, denn eingeführte Phenyl-acetyl-glutaminsäure erscheint unverändert im Harn und nicht als Phenyl-acetyl-glutamin. Dadurch war das Glutamin, das bisher nur in den Pflanzen nachgewiesen worden war, als ein Produkt des tierischen Stoffwechsels festgestellt. Ueber das Vorkommen des Glutamins im

1) Ber. d. d. chem. Ges. 37. 4585 (1904) und 40. 2048 (1907).

2) Ebenda 47. 2630 (1914) und Zeitschr. f. physiol. Chem. 94. 1 (1915).

Eiweißmolekül sagen aber diese Ergebnisse nichts aus, denn das Glutamin, welches die Verbindung mit Phenylessigsäure eingeht, kann erst sekundär durch Eintritt von Ammoniak in die Glutaminsäure entstanden sein. Ein direkter Beweis für das Vorkommen des Glutamins im Eiweiß ist deswegen schwer zu erbringen, weil bei der Spaltung, sowohl durch Säuren, wie durch Basen, das Amid schnell verseift und in die Säure übergeführt wird. Ob Glutamin durch Trypsin gespalten zu werden vermag, ist noch nicht bekannt, aber auch wenn es sich als widerstandsfähig erweisen sollte, dürfte der Versuch mit Hilfe der tryptischen Verdauung die Frage zu entscheiden an der Schwierigkeit, das Glutamin aus der Spaltungsflüssigkeit zu isolieren, scheitern.

Vermutet ist die Anwesenheit von Glutamin und Asparagin im Eiweiß schon lange, und zwar auf Grund der Bildung von Ammoniak bei der Hydrolyse[1]). Osborne vermochte dieser Vermutung einen hohen Grad von Wahrscheinlichkeit zu geben. Er konnte zeigen, daß bei einer großen Zahl von Eiweißstoffen die Mengen von Ammoniak und von Glutamin- + Asparaginsäure, welche bei der Spaltung entstehen, ziemlich genau einander entsprechen, in dem Sinne, daß auf ein Molekül Ammoniak ein Molekül Glutamin- + Asparaginsäure kommt. Um die Annahme noch weiter experimentell zu prüfen, habe ich untersucht, wie sich Eiweiß, glutaminhaltige Polypeptide und Glutamin bei ganz unvollständiger Hydrolyse, bei der es nicht zur maximalen Ammoniakabspaltung kommt, verhalten, ob sich da ein Parallelismus in der Ammoniakbildung feststellen läßt. Von demselben Gedanken ausgehend, hat schon Osborne experimentiert. Er ließ bei 20° 20%ige Salzsäure 17 Stunden auf Gliadin und Asparagin einwirken und fand, daß unter diesen Bedingungen vom ersteren 38,62 % und vom letzteren 13,18 % der maximalen Ammoniakmenge abgegeben werden. Ein Parallelismus zeigte sich also hier nicht.

---

1) Osborne und Gilbert, Americ. Journ. of Physiol. 15. 333 (1906) und Osborne, Leavenworth und Brautlecht, Ebenda 23. 180 (1908/09).

Gegen diesen Versuch ist aber einzuwenden, daß Gliadin, ein Eiweißstoff, welcher bei vollständiger Hydrolyse 43—44% Glutaminsäure[1]) und nur 1% Asparaginsäure liefert, mit Asparagin verglichen wurde und nicht mit Glutamin. Asparagin ist aber schwerer verseifbar als Glutamin. Schon E. Schulze und E. Bosshard[2]) gaben an, daß, während das Asparagin durch Kalkmilch in der Kälte nur sehr wenig angegriffen wird und auch bei der Destillation seiner wässerigen Lösung nur sehr wenig Ammoniak entwickelt, Glutamin unter der Einwirkung der genannten Reagenzien schon beträchtlich zerfällt. Ich konnte feststellen, daß auch gegen Säure das Asparagin weniger empfindlich ist wie das Glutamin. 20%ige Salzsäure spaltete bei niedriger Zimmertemperatur in 24 Stunden aus Glutamin 52,3% der maximalen Ammoniakmenge ab, aus Asparagin nur 19,8% (S. 27).

Ich benutzte zu meinen vergleichenden Untersuchungen Gliadin, einige glutaminhaltige Polypeptide, welche, da sie Glutamin in der, auch im Eiweiß vorkommenden Bindung enthalten, ein besseres Vergleichsobjekt darstellen als Glutamin und Glutamin selbst. In einigen meiner Versuche ging ich ebenso vor wie Osborne, d. h. ich ließ eine 20%ige Salzsäure bei 20° 18 bzw. 22 Stunden auf die Substanzen einwirken und bestimmte dann das abgespaltene Ammoniak (s. Versuch IIa und IIb S. 29). In andern verwendete ich kochende verdünnte Salzsäure, nachdem durch Vorversuche die Kochzeit ermittelt worden war, welche bei der benutzten Säurekonzentration noch nicht zur vollständigen Ammoniakabspaltung führt. Zur Lösung und Hydrolyse wurde ein 7% HCl enthaltender wässeriger Alkohol verwendet. Die Erhitzung dauerte 6 Minuten und zum Schluß wurde das abgespaltene Ammoniak bestimmt (s. Versuch I S. 28).

Die Resultate enthält die Tabelle. Die bei Versuch I angeführten Zahlen sind Mittelwerte.

---

1) Osborne und Guest, Journ. of Biolog., Chem. 9. 425 (1911).
2) Landw. Versuchsstat. 29. 295 (1883).

Abgespaltene Menge NH_3 in Prozenten der maximalen Werte:

	Gliadin	Glycyl-glutaminyl-glycin	Glycyl-d-glutamin	l-Leucyl-d-glutamin	Glutamin
Versuch I HCl in der Hitze	50	50,8	48,5	48	88,7
Versuch IIa HCl bei 20° 18 Stunden	37,45	38,3	—	39	56,4
Versuch IIb HCl bei 20° 22 Stunden	39	38,9	—	38,8	57,7

Aus der Zusammenstellung geht hervor, daß Gliadin und glutaminhaltige Polypeptide sich recht gleichartig verhalten. Die beste Uebereinstimmung zeigt der Versuch IIb. Die größeren Unterschiede im Versuch I erklären sich jedenfalls daraus, daß es unmöglich ist, die Bedingungen, unter denen hier gearbeitet wurde, völlig gleichmäßig zu gestalten. Auf jeden Fall sprechen die Ergebnisse zugunsten der Annahme, daß Glutamin im Eiweißmolekül enthalten ist.

Glutamin zeigt, wie die Tabelle lehrt, ein abweichendes Verhalten. Ein Unterschied zwischen Glutamin und glutaminhaltigen Polypeptiden läßt sich auch gegenüber salpetriger Säure feststellen. Während in diesen die Säureamidgruppe unangegriffen bleibt, reagiert sie bei Glutamin selbst fast vollständig[1]). Beim Asparagin ist das nicht der Fall.

Experimenteller Teil.

Darstellung des d-Glutamins.

Sie geschah nach den Angaben von E. Schulze und und E. Boßhard[2]) aus Runkelrüben. Der ausgepreßte Saft

1) a) 0,0505 g geben nach van Slyke bei 10 Minuten langem Schütteln 15,7 ccm Gas (14°, 739 mm) = 8,81 mg = 17,44 % N.

b) 0,0497 g geben nach van Slyke bei 10 Minuten langem Schütteln 15,6 ccm Gas (17°, 739 mm) = 8,75 mg = 17,61 % N. Theoretisch 19,18 % N.

2) Landw. Versuchsstat. 29. 295 (1883).

wird mit bas. Bleiacetat ausgefällt, und das Filtrat dieser Fällung so lange mit Mercurinitratlösung versetzt, als noch ein Niederschlag entsteht. Dieser wird abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und nach Zerteilung in Wasser mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die von Schwefelquecksilber abgesaugte Flüssigkeit wird nach Neutralisieren mit Ammoniak bei gelinder Wärme unter einem Flügelventilator eingedampft. Die Reaktion wird durch Zusatz von Ammoniak dauernd schwach alkalisch erhalten. Aus der eingeengten Flüssigkeit kristallisiert das Glutamin aus. Aus der eingeengten Mutterlauge lassen sich weitere Mengen gewinnen. Zur Umkristallisation werden 100 g in etwa 300 ccm Wasser unter beständigem Schütteln in der Wärme gelöst. Tierkohle wird hinzugefügt, nochmals ganz kurze Zeit aufgekocht und durch mehrfaches Filter abgesaugt. Aus dem Filtrat scheidet sich das Glutamin in feinen Nadeln ab. Getrocknet stellt es eine lockere Masse dar. Ich habe auch die Fällung statt mit Mercurinitrat mit Mercuriacetat und Natriumkarbonat, welche C. Neuberg und J. Kerb[1]) für die Abscheidung von Aminosäuren empfehlen, ausgeführt, doch ist sie für diesen Zweck nicht geeignet, da sie zu einem weniger reinen Produkt führt. Auch machte sich die Anwesenheit einer kolloidalen Beimengung, welche die Filtration außerordentlich erschwert, unangenehm bemerkbar. Das Glutamin enthielt 18,93% N.

0,1027 g verbrauchten nach Kjeldahl 13,85 ccm n/10 Säure = 19,44 mg N = 18,93%.

Die berechnete Menge beträgt 19,18%.

I. Synthese glutaminhaltiger Polypeptide.

Chloracetyl-d-glutamin.

6,0 g fein pulverisiertes Glutamin werden in 42 ccm eiskalter n-NaOH (Mol.-Menge 41,07 ccm) aufgelöst. 5,57 g Chloracetylchlorid (20% über Mol.-Menge) werden mit absolutem Aether auf 60 ccm gebracht. Zu der Glutaminlösung werden aus Büretten je 2 ccm n-NaOH und je 2 ccm der

1) Biochem. Zeitschr. 40. 498 (1912).

ätherischen Lösung von Chloracetylchlorid zugegeben, darauf wird 40 Sekunden energisch geschüttelt und ca. 30 Sekunden lang im Eiswasser gekühlt. Dieser Vorgang wird bis zum Verbrauch der beiden Lösungen wiederholt. Die Gesamtmenge n-NaOH betrug 60 ccm. Die Reaktion ist dauernd alkalisch. Die Flüssigkeit wird nun mit 9 ccm 5 n-Salzsäure versetzt und im Lindschen Extraktionsapparat ca. 5 Stunden lang mit Aether extrahiert, um Chloressigsäure zu entfernen. Die Analyse des ätherischen Auszugs nach Kjeldahl ergab 0,2 mg N. Daher ergibt diese Extraktion keine nennenswerten Verluste an der gesuchten Substanz. Nach Beendigung der Extraktion wird der Aether abgehoben und die Flüssigkeit unter schwachem Erwärmen (30—40°) unter dem Ventilator auf ein möglichst kleines Volumen eingeengt. Dabei kristallisiert ein Teil des Chloracetylglutamins aus. Der Niederschlag und die Mutterlauge werden nun wieder in den Extraktionsapparat gebracht und mit Essigäther ca. 15 Stunden lang unter zeitweiligem Wechseln der Vorlage extrahiert. Die Substanz kristallisiert beim Erkalten aus dem Essigäther in Nadeln aus. Nach dem Absaugen wird die Mutterlauge durch Abdestillieren des Essigäthers etwa auf die Hälfte gebracht. Es kristallisieren noch kleine Mengen der Substanz aus. Ein weiteres Einengen hat keinen Zweck, da keine nennenswerten Mengen mehr gewonnen werden. Die Ausbeute betrug 6,57 g Substanz = 71,7 % der Theorie. Der Schmelzpunkt lag nach dem Umkristallisieren aus Essigäther bei 129—130°. Beim längeren Kochen lösen sich etwa 0,7 g in 100 ccm Essigäther. Die Substanz löst sich leicht in Aethyl-, Methylalkohol und Wasser, kann auch daraus umkristallisiert werden, aber mit Verlusten; in Aceton löst sie sich etwas schwerer auf, aber leichter wie in Essigäther.

Für die Analyse wird die Substanz aus Essigäther umkristallisiert und über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet, wobei schnell konstantes Gewicht eintritt.

0,0920 g Subst.: 0,1280 g CO_2, 0,0410 g H_2O;
0,1020 „ „ nach Kjeldahl: 9,1 ccm n/10-Säure = 12,78 mg N;
0,1589 „ „ „ Pringsheim: 0,1003 g AgCl;
0,1020 „ „ bei der Titration (Phenolphtalein): 4,6 ccm n/10-Lauge.

$C_7H_{11}N_2O_4Cl$ (222,7):

Ber.: 37,72 % C 4,98 % H 12,58 % N 15,92 % Cl 222,7 Mol.-Gew.
Gef.: 37,94 % C 4,99 % H 12,53 % N 15,61 % Cl 221,8 Mol.-Gew.

Polarisation: sie wird in wässeriger Lösung ausgeführt.

0,2548 g Subst. Gewicht der Lösung 5,5508 g. Spez. Gew. 1,0144. Prozentgehalt 4,588 %. Drehung bei 19° und filtriertem Auerlicht im 2 Dez.-Rohr 0,95° nach links. Also $[\alpha]_D^{19°} = -10{,}20°$.

Glycyl-d-Glutamin.

1,5 g Chloracetyl-d-glutamin werden in 7,7 ccm wässerigem Ammoniak, welches 28 % NH_3 enthält, aufgelöst und ca. 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Reaktionsflüssigkeit bleibt zunächst über Schwefelsäure einige Stunden stehen und wird dann im Vakuum bis zum durchsichtigen Syrup eingeengt. Der Syrup wird in ca. 3 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit 20 ccm absolutem Alkohol unter Umrühren versetzt, die Substanz fällt syrupartig aus. Das Umfällen wird bis zum Verschwinden der Chlorreaktion wiederholt und das jetzt ausgefallene Produkt nach Entfernung der überstehenden Flüssigkeit mit absolutem Alkohol angerieben; die Substanz wird dabei fest und läßt sich abfiltrieren. Die Menge der vakuumtrockenen Substanz betrug 1,1 g. Aus der Mutterlauge werden durch Einengen im Vakuum, Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol noch 0,1 g halogenfreier Substanz erhalten. Die 1,2 g Substanz werden in 4 ccm Wasser gelöst und die Lösung tropfenweise mit absolutem Methylalkohol bis zur bleibenden Trübung versetzt. Dazu waren 10 ccm Methylalkohol nötig. Aus der durch gelindes Erwärmen wieder klar gewordenen Lösung kristallisiert das Glycyl-d-glutamin aus. Die Substanz wird abgesaugt, die Mutterlauge davon wird im Vakuum verdunstet, der Rückstand in Wasser aufgenommen und die Lösung in derselben Weise wie vorher mit absolutem Methylalkohol behandelt. Auf diese Weise wurden 0,59 g = 43,4 % der theoretischen Ausbeute an kristallisierter Substanz gewonnen. Bei einer anderen Darstellung, bei der frisch dargestelltes Chloracetyl-d-glutamin verwendet wurde, war die Ausbeute besser, und die Substanz schied sich bei der

zweiten Fällung mit Alkohol aus wässeriger Lösung nicht mehr als Syrup, sondern schon in fester Form ab. Es wurden 5,2 g Chloracetyl-d-glutamin angewandt und 3,15 g = 66,45 % der theoretischen Ausbeute an kristallisierter Substanz erhalten.

Das aus wässerigem Methylalkohol kristallisierte Produkt enthält ein Molekül Kristallwasser, welches im Schwefelsäurevakuum bei gewöhnlicher Temperatur festgehalten und bei 105° im Vakuum über Phosphorpentoxyd erst allmählich abgegegeben wird. 0,3112 g Substanz verloren 0,0255 g oder 8,19 %, berechnet für $C_7H_{12}N_3O_4 + H_2O$ 8,15 %.

Beim Erhitzen beginnt bei etwa 170° Gelbfärbung, dann Braunfärbung, Sintern und, je nach der Art des Erhitzens, schmilzt die Substanz bei 200°, 204° bzw. 207°.

Für die Analyse und Polarisation wurde die wasserfreie Substanz benutzt.

0,0782 g Subst.: 0,1190 g CO_2, 0,0469 g H_2O;
0,0511 „ „ „ nach Kjeldahl: 7,45 ccm n/10-Säure = 10,46 mg N.

$C_7H_{13}O_4N_3$ (203,1):

Ber.: 41,35 % C 6,45 % H 20,69 % N;
Gef.: 41,50 % C 6,71 % H 20,47 % N.

Polarisation: Die Substanz wurde in Wasser gelöst.

0,3070 g Subst. Gewicht der Lösung 7,3077 g. Prozentgehalt 4,20. Spez. Gew. 1,0138. Drehung bei 15° und filtriertem Auerlicht im 2 Dez.-Rohr 0,21° nach links. Also $[\alpha]_D^{15^\circ} = -2{,}466^\circ$.

Bei der Einwirkung der salpetrigen Säure nach van Slyke wurde stets etwas mehr Stickstoff erhalten, als der primären Aminogruppe entspricht.

1. 0,0455 g Substanz geben bei 10 Minuten langem Schütteln 7,0 ccm Gas (16°, 731 mm) = 3,91 mg N = 8,59 %.

2. 0,0750 g geben bei 10 Minuten langem Schütteln 11,3 ccm Gas (13°, 727 mm) = 3,78 mg N = 8,48 %.

Der Prozentgehalt an primärem Aminostickstoff beträgt 6,90 %.

Das Glycylglutamin verhält sich also wie andere Polypeptide, in denen das Glycin die primäre Aminogruppe trägt. Diese geben nach Abderhalden und van Slyke[1]), im

1) Zeitschr. d. physiol. Chem. 74. 505 (1911).

Gegensatz zu den anderen bereits untersuchten, bei denen die gefundene Stickstoffmenge sehr gut mit der berechneten übereinstimmt, etwas zu viel Stickstoff. Abderhalden und van Slyke fanden, daß durch Multiplikation der erhaltenen Werte mit dem Faktor 0,8 die richtigen erhalten werden. Das gilt auch für das Glycylglutamin, denn 8,59 (Versuch 1) mal 0,8 = 6,87 % und 8,48 (Versuch 2) mal 0,8 = 6,78 %.

Chloracetyl-d-Glutaminylchlorid.

Zur Chlorierung der Carboxylgruppe von Chloracetylglutamin werden möglichst frisch dargestellte Präparate verwendet, da sich die älteren als weniger geeignet erwiesen hatten. 3,0 g im Vakuum getrocknetes und durch möglichst feines Sieb getriebenes Chloracetylglutamin werden in 30 ccm frisch destilliertes Acetylchlorid, welches durch Kältemischung abgekühlt war, eingetragen, dazu werden 3,3 g frisch dargestelltes und pulverisiertes Phosphorpentachlorid portionsweise, unter fortwährendem Schütteln und Kühlung in der Kältemischung zugefügt. Die Reaktion wird in einer gut schließenden Glasstöpselflasche ausgeführt. Die Flasche wird darnach in Eis verpackt und 9 1/2 Stunden lang, unter ein- oder zweimaliger Erneuerung des Eises, geschüttelt. Dann wird die Substanz durch eine Tonzelle in dem von Emil Fischer[1]) konstruierten Apparat unter Vermeidung von Feuchtigkeit abgesaugt, 2—3mal mit frisch destilliertem Acetylchlorid und 2—3mal mit absolutem Petroläther gewaschen und über Phosphorpentoxyd im Vakuum getrocknet. Man soll keinen Exsikkator mit Schwefelsäure benutzen, da die Substanz aus der Schwefelsäure Wasser anzieht und sich zersetzt. Nach dem Trocknen über Nacht betrug das Gewicht der Substanz etwa 3,5 g. Die Chlortitration ergibt verschiedene Werte: 11—17 %, berechnet 14,71 %. Die Substanz gibt beim Aufbewahren im evakuierten Exsikkator dauernd Chlor ab. Bei der offenbar großen Zersetzlichkeit habe ich von der Reindarstellung abgesehen und das Reaktionsprodukt sofort zur Darstellung von Chloracetyl-glutaminyl-glycinester benutzt.

1) Ber. d. d. chem. Ges. 38. 605 (1905).

Chloracetyl-d-glutaminyl-glycinester.

Etwa 4 g frisch dargestellten Glycinesters werden in 50 ccm absolutem Chloroform gelöst und dazu unter Kühlung in Kältemischung und starkem Schütteln portionsweise 3,5 g des obigen Reaktionsproduktes zugegeben. Es erfolgt zunächst Lösung und dann Abscheidung eines feinen Niederschlags. Diese beginnt gewöhnlich schon, ehe die Gesamtmenge völlig eingetragen ist und nimmt während des Stehens im Eisschrank zu. Nach mehreren Stunden wird der Niederschlag möglichst scharf abgenutscht und über Schwefelsäure und Paraffin in Paraffinöl getrocknet. Er hat eine graugrüne Farbe, ist hygroskopisch und wiegt 4—4,5 g. Der Niederschlag wird in ca. 10 ccm absolutem Methylalkohol in der Wärme aufgelöst und die Lösung von etwaigem Rückstand abfiltriert. In der Kälte scheiden sich aus der braungrünen Lösung feine weiße Nadeln aus. Die Kristalle werden abgesaugt und mit eiskaltem absolutem Methylalkohol solange gewaschen, bis die Chlorreaktion verschwunden ist. Ausbeute schwankt zwischen 0,5—0,7 gr = 11,96—16,74 % der Theorie auf Chloracetylglutamin berechnet. Der Schmelzpunkt liegt nach Umkristallisieren aus Methylalkohol bei 198—199°.

Zur Analyse wurde die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz benutzt.

0,1308 g Subst.: 0,2048 g CO_2, 0,0676 g H_2O;
0,0569 „ „ nach Kjeldahl: 5,6 ccm n/10-Säure = 7,86 mg N.

$C_{11}H_{18}O_5N_3Cl$ (307,6):

Ber.:	42,91 % C	5,90 % H	13,67 % N;
Gef.:	42,70 % C	5,78 % H	13,81 % N.

Chloracetyl-d-glutaminyl-glycin.

Die Verseifung des Chloracetyl-glutaminyl-glycinesters erfolgt sehr leicht. 1 g des Esters wird in 17,5 bis 18 ccm Wasser unter Erwärmen gelöst. Sobald gerade die Kristallisation beim Abkühlen beginnt, fügt man schnell 7,2 ccm (etwa 2.2 Mol.) n-NaOH hinzu und kühlt im Eiswasser. Jetzt wird die Flüssigkeit ½ Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen, mit 1,5 ccm 5n-Salzsäure angesäuert und im Lindschen

Apparat mit Essigäther extrahiert. Die Extraktionsdauer beträgt 28 Stunden unter zweimaligem Wechseln der Vorlage. Die Substanz kristallisiert in der Kälte aus. Sie wird abgesaugt. Die eingeengte Mutterlauge liefert noch etwas Substanz. Ausbeute 0,742 g = 81,5 % der Theorie. Die Substanz scheint zuweilen eine amorphe Beschaffenheit zu haben, bei mikroskopischer Betrachtung zeigen sich aber stets feine Nadeln. Sie wird aus 55 Teilen absolutem Alkohol umkristallisiert. Der Schmelzpunkt liegt beim schnellen Erhitzen bei 161°. Zur Analyse diente eine im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz.

0,0464 g Subst.: 0,0661 g CO_2, 0,0217 g H_2O;
0,0538 „ „ nach Kjeldahl: 5,8 ccm = 8,14 mg N.

$C_9H_{14}N_3O_5Cl$ (279,6):

Ber.: 38,63 % C 5,05 % H 15,04 % N;
Gef.: 38,86 % C 5,23 % H 15,14 % N.

Glycyl-d-glutaminyl-glycin.

1 g Chloracetyl-glutaminyl-glycin werden mit 6 ccm wässerigem Ammoniak, welches 28 % NH_3 enthält, bei gewöhnlicher Temperatur etwa 15 Stunden lang stehen gelassen. Dann wird die Lösung über Schwefelsäure in den Exsikkator gebracht und dieser nach einigen Stunden evakuiert. Beim Verdunsten der Lösung scheiden sich Kristalle des Tripeptids aus. Die Lösung wird völlig zur Trockene gebracht, der Rückstand in etwa 10 ccm Wasser aufgenommen und diese Lösung mit absolutem Alkohol bis zur bleibenden Trübung versetzt. Dazu genügten 5 ccm. Beim Stehen in der Kälte scheiden sich Kristalle in feinen Nadeln aus. Aus der Mutterlauge läßt sich zuweilen noch etwas Substanz gewinnen. Die Ausbeute beträgt 0,75 g = 85 % der Theorie. Das Tripeptid wird noch einmal in Wasser aufgenommen, mit Tierkohle kurz aufgekocht und mehrfach filtriert, bis die geringe Opaleszenz verschwunden ist. Bei Zusatz von Alkohol kristallisieren wieder etwa 93 % des gelösten Körpers aus. Die umkristallisierte Substanz schmilzt bei 203° unter Zersetzung, indem vorher Gelbbraunfärbung und Sintern eintritt. Die Analyse wurde mit einer

über Schwefelsäure im Vakuum getrockneten Substanz ausgeführt.

0,0516 g Subst.: 0,0780 g CO_2, 0,0296 g H_2O;
0,0245 „ „ nach Kjeldahl: 3,73 ccm n/10-Säure = 5,24 mg N

$C_9H_{16}N_4O_5$ (260,2):

Ber.: 41,54 % C 6,23 % H 21,55 % N;
Gef.: 41,23 % C 6,42 % H 21,38 % N.

Polarisation: Sie wird in wässeriger Lösung ausgeführt, dabei empfiehlt sich keine wesentlich stärkere Konzentration, als hier angegeben, zu nehmen, da die Substanz sich sonst nicht völlig in Wasser auflöst.

1. 0,3508 g Subst. Gewicht der Lösung 7,8888 g. Prozentgehalt 4,45. Spez. Gew. 1,0153. Drehung bei 18° und Natriumlicht im 2 Dez.-Rohr 2,55° nach links. Also $[\alpha]_D^{18°} = -28{,}24°$.

2. 0,3516 g Subst. Gewicht der Lösung 7,9761 g. Prozentgehalt 4,41. Spez. Gew. 1,0115. Drehung bei 18° und Natriumlicht im 2 Dez.-Rohr 2,54° nach links. Also $[\alpha]_D^{18°} = -28{,}48°$.

Bei der Untersuchung nach van Slyke verhält sich das Tripeptid wie das Glycylglutamin, in dem auch hier zu viel Stickstoff gefunden wird.

0,0499 g gaben nach van Slyke bei 10 Minuten langem Schütteln 6,3 ccm Gas (18°, 730 mm) = 3,47 mg N = 6,96% Der Prozentgehalt an Aminostickstoff in Glycyl-glutaminyl-glycin beträgt 5,385%. Durch Multiplikation des Wertes mit dem Faktor 0,8 erhält man auch hier die berechnete Menge, nämlich 5,58 %.

α-Brompropionyl-d-glutamin.

2,75 g fein gepulvertes Glutamin werden in einer Schüttelflasche, in der sich 18,8 ccm n-NaOH (Mol.-Menge) befinden, und die im Eiswasser steht, eingebracht und durch Schütteln gelöst. Dazu kommen bei einer Temperatur von 10° 5,63 g käufliches Brompropionylbromid (14% über die Mol.-Menge) und 33,4 ccm n-NaOH in 33 Einzelportionen. Nach jedem Zusatz von 0,3 ccm Brompropionylbromid und ca. 1 ccm n-NaOH aus Büretten wird 40 Sekunden stark geschüttelt. Gegen Ende des Versuches wird die Reaktion sauer, und es

entsteht eine geringe Ausscheidung, die abfiltriert wird. Die Flüssigkeit wird in den Lindschen Apparat gebracht und nach Zusatz von 4 ccm 5n-Salzsäure mit Essigäther unter zeitweiligem Wechsel der Vorlage etwa 15 Stunden lang extrahiert. Aus dem Essigäther scheidet sich beim Stehen in der Kälte die Substanz ab, sie wird abgesaugt und die Mutterlauge eingeengt. Es erfolgt noch eine Ausscheidung. Gesamtausbeute 3,26 g = 61,5 % der Theorie.

Da von den beiden für die Kuppelung benutzten Substanzen, die eine optisch aktiv, die andere ein inaktives Gemisch von zwei optischen Antipoden ist, so muß bei einer 50 % der Theorie übersteigenden Ausbeute ein Gemisch von zwei stereoisomeren Formen vorliegen, deren Trennung ich versucht habe.

Es werden die aus mehreren Versuchen erhaltenen Mengen vereinigt und wiederholt aus Essigäther umkristallisiert. Es gelang, so ein Präparat zu erhalten, dessen Drehung beim weiteren Umkristallisieren sich nicht mehr veränderte. Je 0,2548 g von 2 auf einander folgenden Kristallisationen in 5,3 ccm Methylalkohol gelöst gaben eine Drehung von 0,83°. Die im Vakuum bei 80° über Phosphorpentoxyd getrocknete Substanz schmilzt bei 132° und gibt bei der Analyse auf Brompropionylglutamin stimmende Werte. Auch wurde bei der getrockneten Substanz die spezifische Drehung bestimmt.

0,1420 g Subst.: 0,1790 g CO_2, 0,0608 g H_2O;
0,0542 „ „ nach Kjeldahl: 3,8 ccm n/10-Säure = 5,34 mg N;
0,0831 „ „ „ Pringsheim: 0,0567 g AgBr.

$C_8H_{13}O_4N_2Br$ (281):

Ber.:	34,16 % C	4,66 % H	9,97 % N	28,44 % Br;
Gef.:	34,38 % C	4,79 % H	9,85 % N	29,04 % Br.

Polarisation: Die Substanz wird in absolutem Methylalkohol gelöst.

1,0815 g Subst. Gewicht der Lösung 6,2842 g. Prozentgehalt 17,21. Spez. Gew. 0,8824. Drehung bei 13° und Natriumlicht im 2 Dez.-Rohr 3,49° nach links. Also $[\alpha]_D^{13°} = -11,49°$.

1,0457 g Subst. Gewicht der Lösung 6,1425 g. Prozentgehalt 17,02. Spez. Gew. 0,8796. Drehung bei 15° und Natriumlicht im 2 Dez.-Rohr 3,39° nach links. Also $[\alpha]_D^{15°} = -11,32°$.

Da die spezifische Drehung des l-α-Brompropionylglutamin, welches aus dem aktiven l-α-Brompropionylchlorid, wie später beschrieben wird, um einige Grade höher liegt, als bei dem oben beschriebenen Körper, so lag also hier kein reines Isomeres vor.

d-α-Brompropionyl-d-glutamin.

Das für die Synthese erforderliche d-α-Brompropionylchlorid stellte ich nach den Angaben von E. Fischer und seinen Mitarbeitern aus l-Alanin dar. Das l-Alanin war durch partielle Vergärung mit Hefe aus synthetischem Alanin nach F. Ehrlich[1]) gewonnen. Es zeigte die spezifische Drehung $-10{,}1^0$, war also rein. Ich führte es nach E. Fischer und K. Raske[2]) in die d-Brompropionsäure über mit einer Ausbeute von 76,7 % der Theorie. Sie zeigte in einem Dez.-Rohr bei 17^0 eine Drehung von $46{,}25^0$ nach rechts. Aus ihr enthielt ich mittels Thionylchlorid nach E. Fischer und O. Warburg[3]) d-α-Brompropionylchlorid in einer Ausbeute von 89% der Theorie.

Ausführung der Kuppelung.

3 g Glutamin werden in 20,5 ccm eiskalter n-NaOH (Mol.-Menge) gelöst und zu der Lösung im ganzen 3,64 g d-α-Brompropionylchlorid (3,5% über die Mol.-Menge) und 25,6 ccm n-NaOH gegeben. Die Zugabe erfolgt in Einzelportionen von je 0,14 ccm d-α-Brompropionylchlorid und 1,6 ccm n-NaOH. Nach jedem Zusatz wird 1 Minute stark geschüttelt und $^1/_2$ Minute in einem Bad von 10^0 gekühlt. Am Schluß der Reaktion ist die Lösung noch alkalisch. Nun wird sie in den Lindschen Apparat gebracht, mit 4,1 ccm 5n-Salzsäure versetzt und etwa 20 Stunden lang mit Essigäther unter Wechseln der Vorlage extrahiert. Aus dem Essigäther kristallisiert in der Kälte die Hauptmenge des Reaktionsproduktes aus, aus den eingeengten Mutterlaugen läßt sich noch etwas Substanz gewinnen. Ausbeute 4 g = 69,4 % der Theorie.

1) Biochem. Zeitschr. 1. 8 (1906).
2) Ber. d. d. chem. Ges. 39. 3995 (1907).
3) Liebigs Annalen 340. 168 (1905).

Die Substanz löst sich leicht in Aethyl-, Methylalkohol und Wasser auf, läßt sich aber aus absolutem Alkohol und Wasser umkristallisieren. Aus heißem Essigäther, in dem sie sich nur wenig auflöst, kristallisiert sie in Nadeln. Der Schmelzpunkt der 2mal aus Essigäther umkristallisierten Substanz liegt bei 150—152°, nach der Kristallisation aus Wasser bei 158°. Vor dem Schmelzen erfolgt Sintern und Gelbfärbung. Zur Analyse diente ein aus Wasser umkristallisiertes Präparat, welches im Vakuum über Schwefelsäure schnell konstant wurde.

0,1341 g Subst.: 0,1674 g CO_2, 0,0564 g H_2O;
0,1464 „ „ nach Kjeldahl: 10,5 ccm n/10-Säure = 14,74 mg N.

$C_8H_{13}O_4N_2Br$ (281):

Ber.: 34,16 % C 4,66 % H 9,97 % N;
Gef.: 34,05 % C 4,71 % H 10,07 % N.

Polarisation: Dazu wurde ein mehrfach aus Wasser (Lösung 1 : 3) umkristallisiertes Präparat gebraucht, welches beim wiederholten Umkristallisieren eine konstante Drehung zeigte. Die Polarisationsbestimmung geschah in methylalkoholischer Lösung.

1. 0,8015 g Subst. Gewicht der Lösung 7,0142 g. Prozentgehalt 11,41. Spez. Gew. 0,8323. Drehung bei 19° und filtrierten Auerlicht im 2 Dez.-Rohr 1,78° nach rechts. Also $[\alpha]_D^{19°} = +9{,}37°$.

2. 0,8068 g Subst. Gewicht der Lösung 7,0342 g. Prozentgehalt 11,47. Spez. Gew. 0,8471. Drehung bei 19° und filtrierten Auerlicht im 2 Dez.-Rohr 1,8° nach rechts. Also $[\alpha]_D^{19°} = +9{,}26°$.

d-Alanyl-d-glutamin.

Eine Lösung von 0,6 g d-α-Brompropionylglutamin in 3 ccm wässeriger Ammoniaklösung, welche 28% NH_3 enthält, wird im zugeschmolzenen Rohr 1 Stunde im kochenden Wasserbade erhitzt. Die Flüssigkeit wird nach dem Stehen über Schwefelsäure im Vakuum eingeengt, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und die Lösung mit absolutem Alkohol bis zur Trübung versetzt. Das Dipeptid scheidet sich in farblosen Kristallen ab. Ausbeute 0,3 g = 65,2 % der Theorie. Der Körper wird in gleicher Weise umkristallisiert. Schmelzpunkt bei 218° unter Gelbfärbung und Zersetzung. Für die Analyse

wurde ein im Vakuum über Schwefelsäure getrocknetes Präparat benutzt.

0,0884 g Subst.: 0,1430 g CO_2, 0,0575 g H_2O;
0,0445 „ „ nach Kjeldahl: 6,1 ccm n/10-Säure = 8,56 mg N.

$C_8H_{15}O_4N_3$ (217,15):

Ber.: 44,21 % C 6,96 % H 19,35 % N;
Gef.: 44,12 % C 7,28 % H 19,24 % N.

Polarisation: Sie geschah in wässeriger Lösung.

0,6438 g Subst. Gewicht der Lösung 6,9982 g. Prozentgehalt 9,2. Spez. Gew. 1,0413. Drehung bei 18° und filtrierten Auerlicht im 2 Dez.-Rohr 1,75° nach rechts. Also $[\alpha]_D^{18°} = +9{,}13°$.

Mit salpetriger Säure nach van Slyke reagiert nur die primäre Aminogruppe.

0,0490 g in Essigsäure gelöst gaben nach van Slyke bei zehn Minuten langem Schütteln 5,45 ccm Gas (14°, 732 mm) = 3,07 mg N. Ber.: 6,45 % N, Gef.: 6,26 % N.

l-α-Brompropionyl-d-glutamin.

Das zur Synthese dieser Verbindung erforderliche l-α-Brompropionylchlorid wurde aus d-Alanin über die l-Brompropionsäure in derselben Weise dargestellt, wie die entsprechende d-Verbindung. Das d-Alanin, aus Seide gewonnen, zeigte die spez. Drehung + 9,35°. Die l-Brompropionsäure, welche in einer Ausbeute von 72,6 % erhalten wurde, drehte in einem 1 Dez.-Rohr bei 17° und Natriumlicht — 41,6°. Die Ausbeute an dem l-Brompropionylchlorid betrug 88,7 % der Theorie.

Ausführung der Kuppelung.

3,6 g Glutamin werden in 25 ccm eiskalter n-NaOH (etwa Mol.-Menge) gelöst, dazu kommt im ganzen 4,4 g l-α-Brompropionylchlorid (10 % über Mol.-Menge) und 30 ccm n-NaOH. Der Zusatz erfolgt in Einzelportionen von je 0,1 ccm Chlorid und 1,15 ccm NaOH. Nach jedem Zusatz wurde 1 Minute lang stark geschüttelt und ½ Minute im Eiswasser gekühlt. Die Reaktion blieb bis zum Schluß alkalisch. Die Flüssigkeit wird mit 5,2 ccm 5n-Salzsäure versetzt und mit Essigäther im Lindschen Apparat etwa 18 Stunden lang extrahiert. In der

Kälte fällt die Substanz kristallinisch aus, sie wird abgesaugt und die Mutterlauge eingeengt, dabei wird noch etwas Substanz gewonnen. Ausbeute 5,88 g = 85 % der Theorie. Bei einem andern Versuche, bei dem die Reaktion statt bei 0° bei 10° vorgenommen wurde, betrug die Ausbeute nur 76 % der Theorie. Der Schmelzpunkt der aus Wasser umkristallisierten Substanz liegt bei 132°. Der Körper zeigt dieselben Löslichkeitsverhältnisse wie das d-α-Brompropionylglutamin. Die Analyse wird mit einer aus Wasser umkristallisierten und im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Substanz ausgeführt.

0,1095 g Subst.: 0,1361 g CO_2, 0,0472 g H_2O;
0,1300 „ „ nach Kjeldahl: 9,3 ccm n/10-Säure = 13,06 mg N.

$C_8H_{13}O_4N_2Br$ (281):

Ber.:	34,16 % C	4,66 % H	9,97 % N;
Gef.:	33,90 % C	4,82 % H	10,04 % N.

Polarisation: Dafür werden Präparate verschiedener Darstellung benutzt, die aus Essigäther und Wasser umkristallisiert worden waren. Dabei erhielt ich als höchste Werte $[\alpha]_D = -17,4°$ und $-17,26°$. Als Lösung diente absoluter Methylalkohol.

1. 1,0088 g Subst.: Gewicht der Lösung 6,4473 g. Prozentgehalt 15,65. Spez. Gew. 0,8722. Drehung bei 19° und Natriumlicht im 2 Dez.-Rohr 4,75° nach links. Also $[\alpha]_D^{19°} = -17,4°$.

2. 1,5007 g Subst.: Gewicht der Lösung 7,1909 g. Prozentgehalt 20,87. Spez. Gew. 0,9032. Drehung bei 17° und Natriumlicht im 2 Dez.-Rohr 6,51° nach links. Also $[\alpha]_D^{17°} = -17,27°$.

Ein anderes Präparat zeigte aber nur $[\alpha]_D = -16,4°$ und änderte das Drehungsvermögen auch bei zweimaligem Umkristallisieren aus Wasser nicht.

l-Alanyl-d-glutamin.

Das für die Darstellung benutzte l-Brompropionylglutamin zeigt die spez. Drehung −16,4°. Sie geschieht ebenso wie bei d-Alanylglutamin beschrieben. Während das d-Dipeptid außerordentlich leicht kristallisiert, erfolgt die Kristallisation der l-Verbindung sehr schwierig und unvollständig. Auch beim Umkristallisieren ergibt sich dieselbe Schwierigkeit, so daß die Ausbeute eine sehr geringe ist. Die Kristallisation aus der mit

Alkohol versetzten wässerigen Lösung erfolgt in kleinen, der Gefäßwand anhaftenden Warzen oder in lockeren Nadeln. Die Substanz ist leicht löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol. Die Substanz schmilzt unter Braunfärbung bei 213 – 214°. Für die Analyse wird ein im Schwefelsäurevakuum getrocknetes Präparat verwendet.

0,0597 g Subst.: 0,0975 g CO_2, 0,0390 g H_2O;
0,0338 „ „ nach Kjeldahl: 4,6 ccm = 6,46 mg N.

$C_8H_{15}O_4N_3$ (217,15):

Ber.:	44,21 % C	6,96 % H	19,35 % N;
Gef.:	44,54 % C	7,31 % H	19,11 % N.

Polarisation: Sie wird in wässeriger Lösung ausgeführt.

0,3563 g Subst. Gewicht der Lösung 6,3270 g. Prozentgehalt 5,63. Spez. Gew. 1,0163. Drehung bei 15° und filtrierten Auerlicht im 2 Dez.-Rohr 2,3° nach links. Also $[\alpha]_D^{15°} = -20{,}1°$.

α-Bromisocapronyl-d-glutamin.

5,1 g Glutamin werden in 35 ccm eiskalter n-NaOH (Mol.-Menge) gelöst und zu der Lösung 9,18 g (2% über Mol.-Menge) synthetisches α-Bromisocapronylbromid und 35,6 ccm n-NaOH gefügt. Die Zugabe erfolgt in Portionen zu je 0,3 ccm α-Bromisocapronylbromid und je 1,4 ccm n-NaOH. Nach jedem Zusatz wird 40 Sekunden geschüttelt und kurze Zeit in einem Bad von 10° gekühlt. Zum Schluß ist die Reaktion noch alkalisch. Die von einer geringen Abscheidung abfiltrierte Flüssigkeit wird im Lindschen Apparat mit 35 ccm n-Salzsäure versetzt, wobei ein Oel ausfällt, und mit Essigäther etwa 15 Stunden lang extrahiert. Während mehrtägigen Stehens bilden sich im Essigäther zunächst kristallinische und dann amorphe Abscheidungen und in der eingeengten Mutterlauge entstehen weitere amorphe Niederschläge. Da die Ausbeute mehr wie 50% der Theorie beträgt, so muß hier ebenso wie bei der Kuppelung mit inaktivem Brompropionylbromid ein Gemenge von 2 isomeren Formen vorliegen.

I. Kristallisierte Substanz. Durch wiederholtes Umkristallisieren aus Essigäther gelingt es, die amorphe Substanz zu entfernen und eine reine kristallisierte Substanz zu

erhalten, welche beim weiteren Umkristallisieren ihre Drehungsstärke behält. Schmelzpunkt 145—146°. Die im Schwefelsäurevakuum getrocknete Substanz wurde analysiert.

0.1929 g Subst.: 0,2876 g CO_2, 0,1002 g H_2O;
0,1244 „ „ nach Kjeldahl: 7,55 ccm n/10-Säure = 10,6 mg N.;
0,1280 „ „ „ Pringsheim: 0,0752 g AgBr;
0,04905 „ „ Titration (Phenolphtalein): 1,5 ccm n/10 Lauge.

$C_{11}H_{19}O_4N_2Br$ (323):

Ber.:	40,86 % C	5,93 % H	8,67 % N	24,74 % Br 323 M.
Gef.:	40,66 % C	5,81 % H	8,52 % N	25,00 % Br 327 M.

Polarisation: Als Lösungsmittel diente absoluter Methylalkohol.

0,5094 g Subst. Gewicht der Lösung 8,4774 g. Prozentgehalt 6,0. Spez. Gew. 0,8220. Drehung bei 25° und filtrierten Auerlicht im 2 Dez.-Rohr 2,03° nach rechts. Also $[\alpha]_D^{25°} = +20{,}58°$.

Die Substanz stellt, wie sich später (S. 26) gezeigt hat, das reine d-α-Bromisocapronylglutamin dar.

II. Amorphe Substanz. Sie zeigt Linksdrehung, wurde aber nicht im ganz analysenreinen Zustande erhalten. Sie wird lange Zeit im Vakuum über Schwefelsäure bis zur Konstanz getrocknet.

0,1845 g Subst.: 0,2750 g CO_2, 0,0940 g H_2O;
0,1204 „ „ nach Kjeldahl: 6,7 ccm n/10-Säure = 9,41 mg N;
0,1480 „ „ „ Pringsheim: 0,0921 g AgBr.

Gef.: 40,69 % C 5,70 % H 7,81 % N 26,48 % Br.

d-α-Bromisocapronyl-d-glutamin.

Das für die Synthese erforderliche d-α-Bromisocapronylchlorid stellte ich, vom synthetischen Leucin ausgehend, dar. Es wurde zunächst nach E. Fischer und O. Warburg[1]) und E. Fischer[2]) Formyl-d-leucin bereitet, daraus nach E. Fischer[3]) die d-α-Bromisocapronsäure und weiter das Chlorid dargestellt. Die d-α-Bromisocapronsäure drehte im 1 Dez.-Rohr bei Natriumlicht + 40,45°.

1) Ber. d. d. chem. Ges. 38. 3997 (1905).
2) Ebenda 39. 2928 (1906).
3) Ebenda 39. 2929 (1906).

Ausführung der Kuppelung.

4,7 g Glutamin werden in 32,7 ccm eiskalter n-NaOH (Mol.-Menge) gelöst und zur Lösung 7,19 g d-α-Bromisocapronylchlorid (4,8 % über die Mol.-Menge) und 37,2 ccm n-NaOH gefügt. Die Zugabe erfolgt wie im Versuch mit dem inaktiven Bromid. Die Reaktion bleibt dauernd alkalisch. Die Flüssigkeit wird in den Lindschen Apparat gebracht, mit 6,5 ccm 5n-Salzsäure versetzt, wobei eine Ausscheidung erfolgt, und etwa 4 Stunden lang mit Essigäther extrahiert. Aus dem Essigäther kristallisiert die Substanz in kurzen derben Prismen aus. Beim Einengen der Mutterlauge erhält man noch etwas Substanz. Ausbeute 8,26 g = 79 % der Theorie. Der Körper wird aus Essigäther umkristallisiert. Schmelzpunkt 145—146°. Für die Analyse wird die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1659 g Subst.: 0,2491 g CO_2, 0,0884 g H_2O;
0,04905 „ „ nach Kjeldahl: 3 ccm n/10-Säure = 4,21 mg N.

$C_{11}H_{19}O_4N_2Br$ (323):

Ber.:	40,86 % C	5,93 % H	8,67 % N;
Gef.:	40,95 % C	5,96 % N	8,58 % N.

Polarisation: Sie wird in methylalkoholischer Lösung ausgeführt.

0,3820 g Subst. Gewicht der Lösung 6,3255 g. Prozentgehalt 6,04. Spez. Gew. 0,8210. Drehung bei 10° und filtrierten Auerlicht im 2 Dez.-Rohr 2,04° nach rechts. Also $[\alpha]_D^{10°} = +20{,}57°$.

Die Substanz zeigt also denselben Schmelzpunkt und dieselbe spez. Drehung wie die kristallisierte Fraktion, die ich aus dem Gemenge der beiden optisch isomeren Bromisocapronylglutamine, zu deren Darstellung inaktives Bromisocapronylbromid benutzt wurde, erhalten habe (S. 25).

l-Leucyl-d-glutamin.

5 g d-α-Bromisocapronylglutamin werden in 25 ccm wässerigem Ammoniak, welches 28 % NH_3 enthält, gelöst. Die Lösung wird im eingeschmolzenen Rohr 1 Stunde im kochenden Wasserbade erhitzt. Aus der auf schwach erwärmtem Wasser-

bade eingeengten Flüssigkeit kristallisiert die Substanz allmählich aus. Aus der eingeengten Mutterlauge erhält man noch etwas halogenfreie Substanz. Ausbeute 2,22 g = 55,5 % der Theorie. Der Körper ist im kochenden Wasser etwa zu 2 % löslich. Nach Zusatz des gleichen Volumens Alkohol zu der wässerigen Lösung kristallisiert die Substanz in feinen Nadeln aus. Sie schmilzt bei 231—232 °, nachdem vorher Gelb- und Braunfärbung eingetreten war. Zur Analyse wurde eine im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz verwendet.

0,0961 g Subst.: 0,1804 g CO_2, 0,0707 g H_2O;
0,0419 „ „ nach Kjeldahl: 4,8 ccm n/10-Säure = 6,74 mg N.

$C_{11}H_{21}O_4N_3$ (259,2).

Ber.: 50,93 % C 8,17 % H 16,22 % N;
Gef.: 51,20 % C 8,23 % H 16,08 % N.

Polarisation: Auf ein Mol. Substanz werden $1^1/_2$ Mol. Salzsäure genommen und die Lösung mit Wasser verdünnt.

0,3006 g Subst. Gewicht der Lösung 8,1221 g. Prozentgehalt 3,7. Spez. Gew. 1,0102. Drehung bei 15 ° und filtrierten Auerlicht im 2 Dez.-Rohr 0,95 ° nach rechts. Also $[\alpha]_D^{15°} = +12{,}7°$.

II. Ammoniakabspaltung aus Glutamin und Asparagin durch Salzsäure bei Zimmertemperatur.

Das abgespaltene Ammoniak wird hier wie in den folgenden Versuchen nach Krüger und Reich[1]) und Schittenhelm[2]) (unter Benutzung von NaCl, Na_2CO_3 und Alkohol) im Vakuum destilliert und titrimetrisch bestimmt. Die beiden Amide geben bei diesem Verfahren kein Ammoniak ab.

Aus 0,2006 g Glutamin, welche in 10 ccm 20%iger Salzsäure gelöst waren, werden in 24 Stunden bei niedriger Zimmertemperatur 11,41 mg = 5,69 % NH_3 abgespalten. 0,1713 g kristallwasserfreies Asparagin geben unter gleichen Bedingungen 4,26 mg N = 2,46 % NH_3. Die erhaltene Menge beträgt bei Glutamin 52,2 % der maximalen (10,9 %), bei Asparagin 19,8 % der maximalen (12,42 %) Menge [3]).

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. 39. 165 (1903).

2) Ebenda 39. 73 (1903).

3) Theoretisch ist die maximale Menge Ammoniak aus Glutamin 11,66 %, aus wasserfreiem Asparagin 12,9 %. Die von mir benutzten

III. Ammoniakabspaltung aus Gliadin, glutaminhaltigen Polypeptiden und Glutamin unter den gleichen Bedingungen bei unvollständiger Hydrolyse.

Versuch I.

Da die Versuche ganz gleichmäßig durchgeführt werden sollten, mußte ein für alle Substanzen geeignetes Lösungsmittel benutzt werden. Es wird 50%tiger Alkohol, in dem sich Gliadin ohne weiteres, die Polypeptide und Glutamin sofort auf Zusatz von Salzsäure lösen, verwendet. Die Substanz wird in einem Kölbchen mit genau 8 ccm 50%igem Alkohol übergossen, in Lösung gebracht bzw. fein verteilt, die Lösung mit 4 ccm 20%iger Salzsäure aus der Bürette versetzt und genau 6 Minuten am Rückflußkühler erhitzt. Nachdem die Flüssigkeit mit voller Flamme zum Sieden gebracht worden war (1 Minute), wird sie mit kleiner Flamme 5 Minuten im lebhaften Kochen erhalten. Sie wird dann in einen Kolben übergeführt, bei 0° mit Natronlauge bis zur schwach sauren Reaktion versetzt und der Ammoniakbestimmung unterworfen. Die Ausführung aller Versuche ist bis ins einzelne die gleiche: Kölbchen, Brenner, Dreifuß, Drahtnetz sind immer dieselben.

Es geben:

0,1766 g wasserfreies Gliadin	4,48 mg = 2,54 % NH_3	2,55 % = 50 %	
0,1793 „ „ „	4,60 „ = 2,56 % NH_3	d. max. Menge [1]	
0,1010 „ Glycyl-glutaminyl-glyc.	3,41 „ = 3,37 % NH_3	3,33 % = 50,8 %	
0,1002 „ „ „ „	3,29 „ = 3,28 % NH_3	d. max. Menge	
0,2031 „ Glycyl-glutamin	8,38 „ = 4,12 % NH_3	4,07 % = 48,5 %	
0,2013 „ „ „	8,12 „ = 4,03 % NH_3	d. max. Menge	
0,2015 „ l-Leucyl-glutamin	6,30 „ = 3,13 % NH_3	3,16 % = 48 %	
0,1010 „ „ „	3,24 „ = 3,20 % NH_3	d. max. Menge	
0,0980 „ „ „	3,07 „ = 3,13 % NH_3		
0,2045 „ Glutamin	19,93 „ = 9,74 % NH_3	9,67 % = 88,7 %	
0,2028 „ „	19,59 „ = 9,66 % NH_3	d. max. Menge [2]	
0,2017 „ „	19,42 „ = 9,62 % NH_3		

Präparate gaben aber nur 10,9 % bzw. 12,42 %, offenbar deswegen, weil sie eine kleine Menge Glutamin- bzw. Asparaginsäure enthielten.

1) Das Gliadin gab bei völliger Hydrolyse bei 2 Versuchen 5,1 % Ammoniak ab. Die maximale Ammoniakabspaltung wird schon nach 7 Minuten langem Kochen erreicht.

2) Die maximale Menge von Ammoniak, welche das von mir benutzte Glutamin lieferte nach meinen Versuchen 10,9 %. S. 27 Fußnote 3.

Versuch II.

Die abgewogenen Substanzmengen werden in 5 ccm 20%iger Salzsäure gelöst, die Lösungen nach 18 bzw. 22stündigem Stehen bei 20° durch langsamen Zusatz von Natronlauge bei 0° schwach sauer gemacht und der Ammoniakbestimung unterworfen.

a. Nach 18 Stunden geben:

0,0892 g	Gliadin	1,70 mg = 1,91 % NH_3	37,45 % der max. Menge
0,0999 „	Glycyl-glutaminyl-glycin	2,50 „ = 2,50 % NH_3	38,3 % der max. Menge
0,0998 „	l-Leucyl-glutamin	2,55 „ = 2,56 % NH_3	39 % der max. Menge
0,0997 „	Glutamin	6,13 „ = 6,15 % NH_3	56,41 % der max. Menge

b. Nach 22 Stunden geben:

0,1025 g	Gliadin	2,04 mg = 1,99 % NH_3	39 % der max. Menge
0,1002 „	Glycyl-glutaminyl-glycin	2,55 „ = 2,55 % NH_3	38,9 % der max. Menge
0,1000 „	l-Leucyl-glutamin	2,55 „ = 2,55 % NH_3	38,8 % der max. Menge
0,1002 „	Glutamin	6,3 „ = 6,29 % NH_3	57,7 % der max. Menge.